

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/15092

Rec'd PCT/PTO

24 MAY 2005

26.11.03

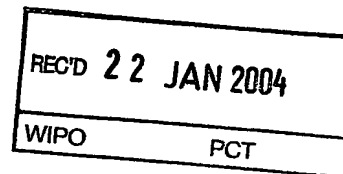
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月26日

出願番号
Application Number: 特願2002-342892
[ST. 10/C]: [JP 2002-342892]

出願人
Applicant(s): 伊藤忠飼料株式会社
不二製油株式会社

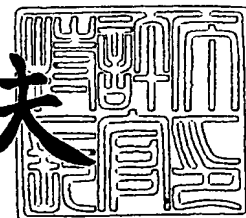


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3108947

【書類名】 特許願

【整理番号】 PY13200TN

【提出日】 平成14年11月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 19/14

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県黒磯市青木 9 1 9 伊藤忠飼料株式会社 研究所
内

【氏名】 森腰 俊亨

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府泉佐野市住吉町 1 不二製油株式会社 阪南事業
所内

【氏名】 横溝 太

【特許出願人】

【識別番号】 390014742

【氏名又は名称】 伊藤忠飼料株式会社

【代表者】 武田 直哉

【特許出願人】

【識別番号】 000236768

【氏名又は名称】 不二製油株式会社

【代表者】 浅原 和人

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 β -1, 4-マンノビオース含有組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法。

【請求項2】 マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法。

【請求項3】 マンナン100重量部に対して、50～10000重量部の水を添加して、マンナン分解酵素を作用させることを特徴とする請求項1又は2記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法。

【請求項4】 分解前のマンナンに対して20～80重量%の β -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法。

【請求項5】 マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び／又はコプラミールであることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られる β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤。

【請求項7】 請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られる β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料。

【請求項8】 β -1, 4-マンノビオースが0.001～1重量%含有されていることを特徴とする請求項7記載の飼料。

【請求項9】 マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも3重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含むこと

を特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物。

【請求項10】 マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含むことを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物。

【請求項11】 マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び／又はコブラミールであることを特徴とする請求項9又は10記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物。

【請求項12】 請求項9～11のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含むことを特徴とする飼料用添加剤。

【請求項13】 請求項9～11のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料。

【請求項14】 β -1, 4-マンノビオースが0.001～1重量%含有されていることを特徴とする請求項13記載の飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 β -1, 4-マンノビオース (β -1,4-mannobiose) 含有組成物やその製造方法、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤、及び β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した飼料、特に家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうる飼料に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来より、パーム核ミール、コブラミール、グアーミール等には、マンノースを構成糖とするマンナンが豊富に含有されることが知られており、これらの天然原料に酵素を作用させてマンノース、マンノオリゴ糖、マンノース多糖類を生成させる方法が種々提案されている。また、このようなマンノース類が添加された飼料には、有害細菌であるサルモネラ菌の腸内での定着を抑制して体外へ排出す

る排菌効果（サルモネラ菌定着抑制効果）を有することが知られており、この効果を利用した技術も種々提案されている（例えば、非特許文献1）。

【0003】

例えば、グアーミールやコブラミールなどマンナンを含む素材を酵素分解して得られる、マンノビオース及びマンノトリオースを主成分とし単糖類が混合したマンノオリゴ糖類を配合した飼料は、鶏の卵の品質を向上させることができることが報告されており、同時に、マンノオリゴ糖類がサルモネラ菌の家畜腸内での定着防止に有用である可能性があることが報告されている（特許文献1）。また、マンノース、メチル- α -マンノシド、マンノオリゴ糖や、グアーガム、ローカストビーンガム又は酵母から得られるマンナンの酵素及び／又は酸による加水分解物等のマンノース類を配合する飼料が、サルモネラ菌など有害細菌の感染予防に有用であることが報告されている（特許文献2）。さらには、マンノースの繰返し単位が40～100の多糖を中心（30～80%）とし、オリゴ糖も（5～30%）混在するマンノース系多糖体を配合する家畜用飼料が、サルモネラ菌の家畜腸内での定着防止に効果があることが報告されている（特許文献3）。また、パーム核ミールやグアーミール等のマンナンリッチな原料に酵素を作用させてマンノオリゴ糖に分解したものを配合した飼料や、コブラミールに酵素を作用させたマンノースを含有する飼料、パーム核ミールを用いたマンノース及び／又はマンノオリゴ糖の製造方法が報告されている（特許文献4、特許文献5、特許文献6）。

【0004】

【非特許文献1】

「Poultry Science」 1989年 第68号 p. 1357

【特許文献1】

特開平7-236429号公報

【特許文献2】

特開平8-38064号公報

【特許文献3】

特開平8-173055号公報

【特許文献4】

WO 95/17103号公報

【特許文献5】

WO 99/08544号公報

【特許文献6】

特開 2001-231591号公報

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように種々の提案がなされているが、サルモネラ菌の家畜腸内での定着防止効果は十分でないのが現状であり、更なる改良が望まれている。例えば、マンノースにはサルモネラ菌定着抑制効果（サルモネラ菌排除効果）があるものの、それ自体単純な糖であるため、飼料として家畜に供与しても、大部分は腸内細菌類により簡単に資化されることがわかっており、また、家畜自身によっても消化吸収・排泄がなされるであろうと考えられる。また、本発明者らの実験結果によって、家畜の免疫強化のために生菌剤を投与した場合、さらにマンノース分解活性が強くなり、サルモネラ対策として給与したマンノースは大部分が消失するという知見が得られた。従って、実際に十分なサルモネラ菌の定着抑制効果を得るためには極めて多量のマンノースを投与しなければならない。一方、酵母を用いた凝集試験によると、マンノビオースよりも分子量の大きなマンノオリゴ糖やマンノース系多糖体のサルモネラ菌定着抑制効果は小さいという知見が得られた。本発明はかかる実状に鑑みてなされたものであり、本発明の課題は、動物体内でのサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる β -1, 4-マンノビオース含有組成物及びその製造方法、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤や、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した飼料を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、 β -1, 4-マンノビオースにサルモネラ認識活性があり、マンノースに比べサルモネラ認識能がやや劣るものの、家畜腸内の

細菌類によって資化されにくいので、サルモネラ菌定着抑制においてはマンノース以上に有効に働き得るとの知見を得た。そこで、効率的な β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法を確立し、得られた β -1, 4-マンノビオース含有組成物が高含量で β -1, 4-マンノビオースを含むことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法（請求項1）や、マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法（請求項2）や、マンナン100重量部に対して、50～10000重量部の水を添加して、マンナン分解酵素を作用させることを特徴とする請求項1又は2記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法（請求項3）や、分解前のマンナンに対して20～80重量%の β -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法（請求項4）や、マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び／又はコプラミールであることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法（請求項5）に関する。

【0008】

また、本発明は、請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られる β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤（請求項6）や、請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られる β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料（請求項7）や、 β -1, 4-マンノビオースが0.001～1重量%含有されていることを特徴とする請求項7記載の飼料（請求項8）や、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少

なくとも 3 重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含むことを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物（請求項 9）や、マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも 10 重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含むことを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物（請求項 10）や、マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び／又はコプラミールであることを特徴とする請求項 9 又は 10 記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物（請求項 11）や、請求項 9～11 のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含むことを特徴とする飼料用添加剤（請求項 12）や、請求項 9～11 のいずれか記載の β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料（請求項 13）や、 β -1, 4-マンノビオースが 0.001～1 重量%含有されていることを特徴とする請求項 13 記載の飼料（請求項 14）に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法としては、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、マンナン含有天然物中のマンナンの加水分解等により、分解前のマンナンに対して少なくとも 10 重量%以上（10～100 重量%）の β -1, 4-マンノビオースを生成させる製造方法や、マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも 10 重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを生成させる製造方法であれば特に制限されるものではないが、分解前のマンナンに対して 20～80 重量%の β -1, 4-マンノビオースを生成させることが好ましく、30～80 重量%の β -1, 4-マンノビオースを生成させることがさらに好ましい。

【0010】

本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物としては、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも 3 重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含む β -1, 4-マンノビオース含有組成物や

、マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含む β -1, 4-マンノビオース含有組成物であれば特に制限されるものではなく、かかる β -1, 4-マンノビオース含有組成物は、例えば、上記本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法により製造することができる。

【0011】

本発明の飼料用添加剤としては、上記本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法により得られる β -1, 4-マンノビオース含有組成物や、上記本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤であれば特に制限されるものではなく、かかる飼料用添加剤として、これら β -1, 4-マンノビオース含有組成物からなるものや、これら β -1, 4-マンノビオース含有組成物に保存料等の他の添加成分が配合されたものを例示することができる。

【0012】

また、上記 β -1, 4-マンノビオース含有組成物や飼料用添加剤の使用形態としては、酵素処理物そのものやその乾燥物、酵素処理後にマンノビオースを水等により抽出したその抽出物やその乾燥物など特に制限されるものではない。

【0013】

上記マンナン含有天然物としては、 β -1, 4結合したマンノースを含有するものであれば特に制限されるものではなく、例えば、コブラミール、パーム核ミール、グアーミール等の高等植物由来のマンナンを挙げることができ、入手の容易な点、マンナンリッチな点等から、コブラミール、パーム核ミールが好ましい。また、マンナン含有天然物から、ミセルを作り水不溶のマンナンを抽出する方法としては、アルカリ溶液、例えば5%冷水酸化ナトリウム液や、10%水酸化ナトリウム液での抽出方法を例示することができる。

【0014】

使用するマンナン分解酵素としては、マンナナーゼ、マンノシダーゼ、ヘミセルラーゼ等のマンナンを分解し β -1, 4-マンノビオースを生成する活性を有するものや、マンナンから生成したマンノースから β -1, 4-マンノビオース

合成する活性を有するものであれば特に制限されるものではないが、*Aspergillus niger* 由来のもので、市販されているもの、例えば、ヘミセルラーゼGM「アマノ」(天野製薬株式会社製)、スミチームACH(新日本化学工業株式会社製)、セルロシンGM5(阪急バイオインダストリー株式会社製)等を好適に使用することができるほか、キシラナーゼ、セルラーゼとして市販されているものでも当該加水分解活性のあるものが使用でき、例えば、セルラーゼY-NC(ヤクルト薬品工業株式会社製)等を使用することができる。これらの中でも、マンノシダーゼ(exo型)活性が低く、マンナナーゼ(endo型)活性が高い酵素が好ましく、具体的には、ヘミセルラーゼGM「アマノ」(天野製薬株式会社製)、スミチームACH(新日本化学工業株式会社製)が、マンノースの生成を抑えると共に多量にマンノビオースを生成させることができることから好ましい。このように、 β -1, 4-マンノビオースは、 β -1, 4-マンナン(β -1,4-Mannan)を分解する方法によっても得ることができ、マンノースから合成する方法によって得ることもできるが、その原料の資源性及び反応効率の観点から、 β -1, 4-マンナンを分解する方法がより簡便であり好ましい。

【0015】

本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造においては、マンナン含有天然物又はマンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させるが、かかるマンナン分解酵素は、水に溶解あるいは分散させた酵素液として用いることが好ましい。効率的な反応を行うためには、マンナン含有天然物又はマンナン、マンナン分解酵素及び水からなる反応系における水分の調整が重要である。水分調整のための水の添加量としては、マンナン100重量部に対して50~10000重量部であることが好ましく、100~1500重量部であることがより好ましい。水の添加量を上記範囲とすることにより、反応系に十分な水分が存在し、マンナン類の繊維質が十分に膨潤して酵素液が接触しやすくなり、効率的にマンノビオースを生成することができる。また、上記範囲にすることにより、水分過多によって生じる酵素濃度希釈に伴う反応効率の低下を抑制することができると共に、乾燥工程における乾燥コストの上昇を抑制することができる。また、酵素量、反応時間としては、生成するマンノビオースが分解前の

マンナンに対して少なくとも10重量%となれば特に制限はないが、マンナーゼ (endo 型) 活性が高い酵素を使用した場合でも、通常マンノシダーゼ (exo 型) 活性も有しておりマンノビオースが分解されるため、反応時間を必要以上に長時間としないことが好ましい。

【0016】

例えば、原料としてパームカーネルミール (マンナン含有量は、およそ36重量%) を用いて3～36時間反応させた場合、 β -1, 4-マンノビオース量は使用する酵素の種類や量、時間にもよるが、原料100重量部に対して、6～17重量部程度まで生成することができる。本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法により得られる β -1, 4-マンノビオース含有組成物の中でも、乾物換算で少なくとも3重量%以上、好ましくは10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含有するものが飼料用添加剤又は飼料として好ましい。

【0017】

本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物は、家畜又は家禽腸内におけるサルモネラ菌の定着を抑制のための飼料用添加剤として使用することができ、家畜の免疫強化のために成鶏盲腸内容菌などの生菌剤を併用する場合においては資化されにくいことから特に有用である。 β -1, 4-マンノビオース含有組成物は、例えば、そのまま飼料として用いることができ、飼料に添加することもできる。この β -1, 4-マンノビオース含有組成物は、マンノビオースの他にマンノースやマンノオリゴ糖類なども含有するが、特にマンノビオースのみを抽出・精製する必要はなく、むしろこれらが含まれていることが好ましい。 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を飼料に添加する場合、マンノビオースが、飼料中、0.001～1重量%含有されるように添加することが好ましく、0.005～0.1重量%含有されるように添加することがより好ましい。マンノビオースの含有量が上記範囲にあることにより本発明の効果をより効率的に奏することができる。また、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を例えば飼料添加用としてそのまま流通、使用する場合には、黴、菌類の発生が危惧されることになるため、流動層乾燥、真空乾燥等の方法によって、水分が10重量%以下となるよ

うに乾燥することが好ましい。

【0018】

本発明のサルモネラ菌の定着を抑制しうる飼料としては、上記本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法により得られる β -1, 4-マンノビオース含有組成物や、上記本発明の β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した飼料であれば特に制限されるものではなく、かかる本発明の飼料を家畜又は家禽に、固体状若しくは液状で給餌することにより、動物体内のサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる。 β -1, 4-マンノビオースは、マンノースに比べサルモネラ認識能がやや劣るもの、家畜腸内の細菌類によって資化されにくいので、サルモネラ菌定着抑制においてはマンノース以上に有効に働き、効率的にサルモネラ菌を体外へ排出することができ、飼料中のマンノース類の含有量を少量化することが可能となって、経済的負担が大幅に軽減されることになる。

【0019】

【実施例】

以下、本発明の実施例を示し、本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。実施例中の「部」、「%」は、特に断りがない限り、それぞれ「重量部」、「重量%」を表す。

実施例1（パームカーネルミールから β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造）

マンナン含有量36%、水分8.2%のパームカーネルミール（不二製油株式会社製）100部に、酵素ヘミセルラーゼGM「アマノ」（天野製薬株式会社製）0.25部を溶解した酵素液150部を、60℃で12時間作用させた後、流動層乾燥装置（大河原製作所製）にて水分9.8%まで乾燥させ、乾燥粉体102部を得た。この乾燥粉体のマンノース含有量及び β -1, 4-マンノビオース含有量をイオン交換クロマトグラフィー法で測定したところ、マンノースが1.44部、 β -1, 4-マンノビオースが10.58部（マンナンに対し29.4%；乾物換算で11.5%）生成していた。

【0020】

実施例 2 (コブラミールから β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造)

コブラミール (マンナン含有量 30%、水分 4.2%) 100 部に、酵素ヘミセルラーゼ GM「アマノ」(天野製薬株式会社製) 0.25 部を溶解した酵素液 150 部を、60℃で 12 時間作用させた後、流動層乾燥装置にて水分 9.3% まで乾燥させ、乾燥粉体 106 部を得た。この乾燥粉体のマンノース含有量及び β -1, 4-マンノビオース含有量を測定したところ、マンノースが 1.36 部、 β -1, 4-マンノビオースが 12.35 部 (マンナンに対し 41.2%; 乾物換算で 12.9%) 生成していた。

【0021】

比較例 1

パームカーネルミール (マンナン含有量 36%、水分 8.2%) 100 部に、酵素セルロシン GM5 (エイチビィアイ株式会社製) 0.3 部を溶解した酵素液 150 部を、60℃で 72 時間作用させた後、流動層乾燥装置にて水分 7.8% まで乾燥させ、乾燥粉体 100 部を得た。この乾燥粉体のマンノース含有量及び β -1, 4-マンノビオース含有量を測定したところ、マンノースが 11.52 部、 β -1, 4-マンノビオースが 2.57 部 (マンナンに対し 7.14%; 乾物換算で 2.79%) 生成していた。

【0022】

実施例 3 (サルモネラ菌・酵母凝集抑制試験)

各種糖類のサルモネラ菌凝集抑制試験を以下のように行った。サルモネラ菌サルモネラ・エンテリティディス (伊藤忠飼料株式会社にて分離した *Salmonella enteritidis* KTE-61 株・菌数 1×10^8 cfu/ml) の懸濁液 0.1 ml 及び蒸留水 0.1 ml を十分混合させ、これに酵母キャンディダ・アルビカンス (社団法人動物用生物学的製剤協会より購入した *Candida albicans* KI-102001) 懸濁液 0.1 ml を加え混合した。この混合液に凝集が生じることを実体顕微鏡 (オリンパス社製) で確認する予備試験を行った。

【0023】

実施例 1 で得られた乾燥粉体 0.5 g を水 5 ml に混合懸濁した後、10000 rpm で 5 分間遠心分離し、その遠心上清から高速液体クロマトグラフィ (日

本分光社製)により、 β -1, 4-マンノビオースを約10mg分取した。次に、上記予備試験と同様の方法で、蒸留水に代えて上記分取した β -1, 4-マンノビオース及びマンノース試薬(和光純薬社製; D-Mannose)を使用した糖水溶液を用い、それぞれ濃度を変化させて混合液の凝集を阻害する最低濃度(凝集抑制最低濃度)を求めた。表1に、混合液の凝集を阻害する実際の凝集抑制最低濃度、及びマンノースの凝集抑制最低濃度を1とした場合の相対濃度(濃度比)を示す。表1から明らかなように、 β -1, 4-マンノビオースは、サルモネラ菌による凝集を阻害するためにはマンノースの2倍程度の量が必要となることが判明した。

【0024】

【表1】

	実際の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	相対濃度 (対マンノース)
マンノース(D-mannose)	594	1.000
マンノビオース	1290	2.173

【0025】

実施例4 (代謝試験)

実施例1、実施例2及び比較例1で得られた乾燥粉体に水を加え10倍量の懸濁液とした。また、マンノース試薬の1%水溶液を準備した。以上4点の懸濁液又は水溶液に鶏盲腸内容構成菌培養物であるインテクリーン(伊藤忠飼料株式会社製)を接種し、37℃にてマンノース、 β -1, 4-マンノビオースの代謝を調査した。培養開始時及び20時間培養後の懸濁液又は溶液をサンプリングし、10000rpmで10分間の遠心分離後、その上澄をイオン交換クロマトグラフィにてそれぞれの成分の含有量(mg/g)を調べた。その結果を表2に示す。表2から明らかなように、比較例1のマンノースは66%減少し、マンノース試薬においても69%が減少しており、マンノースは腸内細菌により非常に代謝されやすいことが判明した。これに対し、実施例1の β -1, 4-マンノビオースの減少量は16%であり、実施例2においても β -1, 4-マンノビオースの減少量は17%であり、マンノースに比して明らかに代謝率が低いことが判明し

た。

【0026】

【表2】

	培養開始時 (mg/g)		20時間嫌気培養後 (mg/g)	
	マンノース	マンノビオース	マンノース	マンノビオース
実施例1	1.88	10.91	0.03	9.15
実施例2	1.76	12.15	0	10.03
比較例1	10.45	2.53	3.57	2.12
マンノース1%	9.45	0	2.93	0

【0027】

上記凝集試験及び代謝試験の結果から、 β -1, 4-マンノビオースは、マンノースに比べサルモネラ認識能がやや劣るもの、家畜腸内の細菌類によって資化されにくいので、サルモネラ菌定着抑制においてはマンノース以上に有効に働き、効率的にサルモネラ菌を体外へ排出することができることがわかる。また、代謝試験の結果より β -1, 4-マンノビオースは資化されにくいので、家畜の免疫強化のために成鶏盲腸内容菌などの生菌剤を併用する場合に特に有用であることがわかる。

【0028】

実施例5（動物試験）

市販コマーシャル採卵鶏初生オスヒナ150羽を3分し、市販コマーシャルブロイラー用配合飼料（商品名：アマタケS、薬剤無添加／伊藤忠飼料株式会社製）を給与した50羽の対照区、同配合飼料に実施例2で得られた乾燥粉体を0.1%添加した飼料を給与した50羽の区、及び比較例1で得られた乾燥粉体を0.1%添加した飼料を給与した50羽の区の合計3区を設定し、不断給餌、自由飲水にて飼育した。3日令でサルモネラ菌（*Salmonella enteritidis* KTE-61株）、 3.9×10^8 cfu/羽を経口接種させた。サルモネラ菌接種後5日、10日、17日において各区、盲腸内容物中のサルモネラ菌数（対数）を調べた。その結果を表3に示し、それをグラフで表したものが図1である。

【0029】

【表 3】

	SE接種後 5 日 (log cfu/g)	SE接種後 10 日 (log cfu/g)	SE接種後 17 日 (log cfu/g)
対照区(無添加)	6.37	4.97	3.53
比較例 1 (酵素処理パーム核ミール、マンノース型)	6.31	4.67	2.64
実施例 2 (酵素処理コブラミール、 β マンノビオース型)	6.07	4.09	2.42

【0030】

表 3 及び図 1 から明らかなように、実施例 2 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区及び比較例 1 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区はともに全試験期間を通じて対照区より菌数が少なく、サルモネラ菌を有効に減少させていることが判明したが、特に実施例 2 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区は、比較例 1 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区に比してより少ない菌数を示しており、さらに効果的に作用することが判明した。

【0031】

【発明の効果】

本発明によれば、動物体内でのサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる β -1, 4-マンノビオース含有組成物及びその製造方法、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤や、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した飼料を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

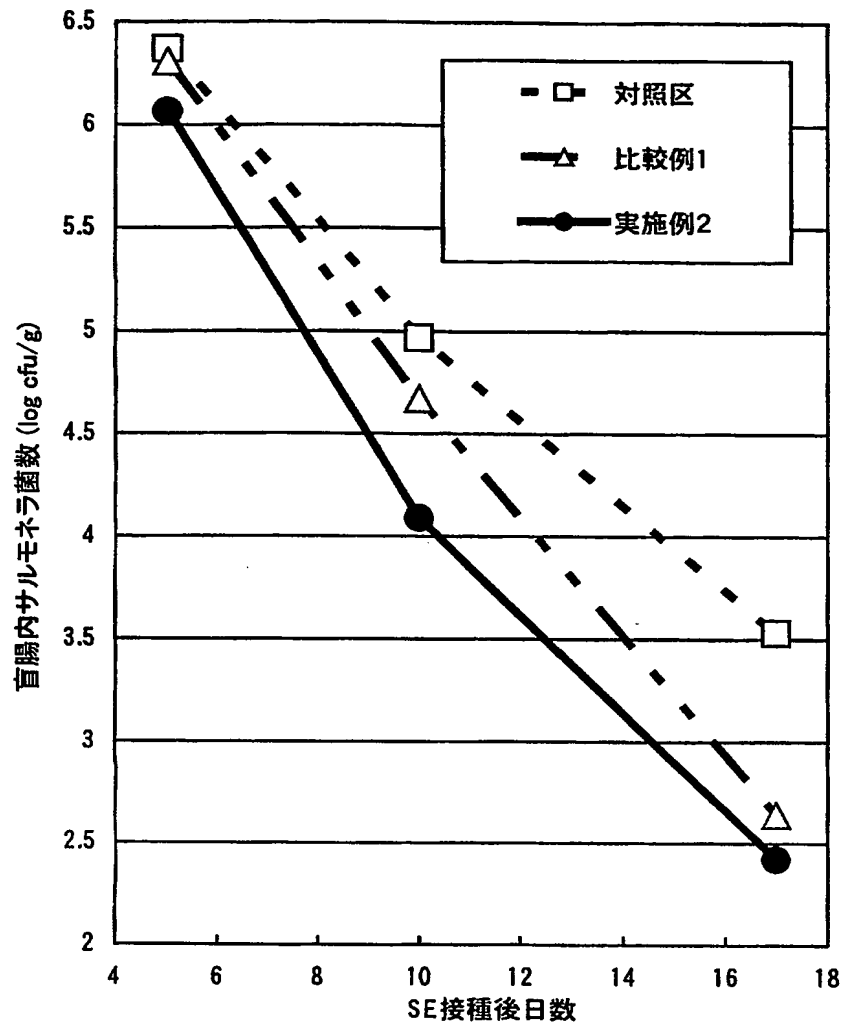
【図 1】

本発明に係る飼料、比較例 1 に係る飼料、市販飼料を給与したオスヒナのサルモネラ菌接種後日数に対する盲腸内サルモネラ菌数を表すグラフである。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 動物体内でのサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる β -1, 4-マンノビオース含有組成物及びその製造方法、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤や、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した飼料を提供すること。

【解決手段】 マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも10重量%以上の β -1, 4-マンノビオースを含むことを特徴とする β -1, 4-マンノビオース含有組成物、 β -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤、及び β -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した飼料である。

特願2002-342892

出願人履歴情報

識別番号

[390014742]

1. 変更年月日

1991年 7月15日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都江東区亀戸2丁目35番13号

氏 名

伊藤忠飼料株式会社

特願2002-342892

出願人履歴情報

識別番号

[000236768]

1. 変更年月日

1993年11月19日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号

氏 名

不二製油株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.